



OPTIMASI DAN PEMEKATAN LIPASE *Bacillus halodurans* CM1

OPTIMIZATION AND CONCENTRATION OF LIPASE FROM *Bacillus halodurans* CM1

Arina Aisyah^{1*}, Wibowo Mangunwardoyo², Trismilah³, Dadang Suhendar³

¹Program Pascasarjana Biologi, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia, Depok 16424

²Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia, Depok 16424

³Laboratorium Pengembangan Teknologi Industri Agro dan Biomedika, Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi, Serpong 15314

*Corresponding author: arinaisyah@hotmail.com

Naskah Diterima: 17 Februari 2017; Direvisi: 12 Mei 2017; Disetujui: 02 Juni 2017

Abstrak

Lipase diketahui memiliki peranan penting dalam bidang industri. Produksi lipase dapat dihasilkan oleh kapang, khamir, dan bakteri. Penelitian bertujuan untuk meningkatkan aktivitas lipase yang dihasilkan oleh *Bacillus halodurans* CM1. Aktivitas lipase dapat ditingkatkan dengan optimasi komposisi media, mutasi bakteri dengan radiasi gamma dan *N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine* (NTG). Enzim yang dihasilkan dipekatkan dengan metode *stirred-cell ultrafiltration* (UF)-ammonium sulfat dan UF-Polyethylene glycol (PEG). Uji aktivitas dilakukan pada tujuh media yang berbeda untuk mendapatkan media produksi. Delapan variabel komposisi media dioptimasi dengan rancangan Plackett-Burman. Bakteri dimutasi dengan radiasi gamma dosis 0,1–0,4 kGy dan NTG 0,05–0,15 mg/mL dengan waktu inkubasi 1–3 jam. Hasil penelitian menunjukkan bahwa media produksi yang digunakan berdasarkan optimasi media dan komposisi media Plackett-Burman adalah media dasar Bora & Bora yang mengandung 0,5% *palm oil* (PO) dan 0,09% CaCl₂. Aktivitas lipase optimal diproduksi oleh bakteri hasil mutasi dengan NTG 0,1 mg/mL yang diinkubasi selama 3 jam. Pemekatan enzim UF-ammonium sulfat dan UF-PEG mampu meningkatkan aktivitas enzim lipase sebesar 18,44%.

Kata kunci: *Bacillus halodurans*; lipase; mutasi; optimasi; pemekatan enzim

Abstract

Lipase is known to have an important role in the industrial field. Lipase can be produced by molds, yeasts, and bacteria. The research aimed to increase the activity of lipase produced by *Bacillus halodurans* CM1. Lipase activity can be improved by optimization of the composition of the media, the mutation of bacteria with gamma radiation and *N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine* (NTG). The enzyme was concentrated by *stirred-cell ultrafiltration* method (UF)-ammonium sulfate and UF-Polyethylene glycol (PEG). The activity test was performed on seven different media to get production media. The eight variables of the media composition were optimized by Plackett-Burman design. The bacteria were subject to mutation by using 0.1–0.4 kGy dose of gamma radiation and 0.05–0.15 mg/mL NTG with incubation time for 1–3 hours. The results showed that the production media used based on optimization and composition of Plackett-Burman media was Bora Bora medium that containing 0.5% *palm oil* (PO) and 0.09% CaCl₂. Optimum lipase activity was produced by the bacterium that mutated with 0.1 mg/mL NTG, incubated for 3 hours. The concentrated by UF-ammonium sulfate and UF-PEG could increase the lipase activity by 18.44%.

Keywords: *Bacillus halodurans*; enzyme concentration; lipase; mutation; optimization

Permalink/DOI: <http://dx.doi.org/10.15408/kauniyah.v10i2.4908>

PENDAHULUAN

Lipase (EC 3.1.1.3) merupakan enzim hidrolisis yang mengkatalis hidrolisis *triacylglycerol* menjadi *glycerol* dan asam lemak dengan melepaskan gugus asam dan alkohol, serta mengkatalis reaksi seperti esterifikasi dan transesterifikasi (Damaso *et al.*, 2008; Mala & Takeuchi, 2008). Kemampuan tersebut menyebabkan lipase memiliki peranan penting dalam bidang industri dan proses kimia organik, seperti industri makanan, kimia, farmasi, kertas, kosmetik, agrokimia, dan deterjen (Anbu *et al.*, 2013).

Lipase diproduksi oleh banyak mikroorganisme, seperti bakteri, kapang, dan khamir (Devi *et al.*, 2012). Sharma *et al.* (2001) mengatakan bahwa bakteri dari genus *Bacillus* mampu menghasilkan lipase. Berdasarkan penelitian pendahuluan yang dilakukan oleh tim BPP Teknologi, *Bacillus halodurans* CM1, diisolasi dari sumber air panas, Cimanggu, Jawa Barat berpotensi dalam menghasilkan enzim ekstraselular, seperti xilanase dan protease (Ulfah *et al.*, 2011). Penelitian mengenai produksi dan optimasi lipase sudah banyak dilakukan pada bakteri *Bacillus*, namun pada *B. halodurans* belum diketahui kemampuannya dalam menghasilkan lipase.

Produksi lipase oleh mikroorganisme dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti sumber karbon dan nitrogen, pH, serta suhu. Faktor-faktor tersebut perlu diatur, sehingga dapat menghasilkan kondisi optimum untuk produksi lipase. Peningkatan aktivitas lipase dapat ditingkatkan dengan mengoptimasi komposisi dan kondisi medium menggunakan suatu metode statistik. Plackett-Burman merupakan salah satu bagian dari metode permukaan respon (RSM) yang dapat menentukan kondisi optimum menggunakan analisis statistik, di mana tiap variabel yang digunakan terdiri dari rentang nilai terendah dan nilai tertinggi dengan mengandung respon optimal (Liu *et al.* 2012). Abdel-Fattah *et al.* (2002) menggunakan lima belas variabel faktor dalam rancangan Plackett-Burman untuk produksi lipase dari *Bacillus* sp. Rancangan Plackett-Burman diharapkan mampu membantu meningkatkan aktivitas lipase.

Selain dengan optimasi komposisi dan kondisi media, peningkatan aktivitas lipase

juga dapat dilakukan dengan meningkatkan kemampuan *strain* bakteri dalam menghasilkan produk (Vu *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2011; Sharma & Singh, 2012; Shahbazi *et al.*, 2014). Vu *et al.* (2011) melakukan mutasi dengan radiasi gamma dan *N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine* (NTG) untuk meningkatkan produksi selulase. Mutasi juga dapat diprediksi dengan metode bioinformatika, seperti yang dilakukan oleh Tambunan *et al.* (2014) terhadap *Candida antartica* yang menghasilkan lipase.

Penelitian yang dilakukan bertujuan untuk meningkatkan aktivitas lipase yang dihasilkan oleh *B. halodurans* CM1. Peningkatan aktivitas dilakukan dengan mengoptimasi komposisi dan kondisi media produksi enzim serta meningkatkan kemampuan bakteri dalam menghasilkan enzim dengan mutasi. Pemekatan enzim dilakukan dengan pendekatan filtrasi dan pengendapan.

MATERIAL DAN METODE

Bahan

Bacillus halodurans CM1 koleksi LAPTIAB BPP Teknologi, perangkat radiasi gamma (BATAN), *N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine* (NTG), ammonium sulfat, dan *polyethylene glycol* (PEG).

Cara Kerja

Penentuan Media Produksi

Bakteri dibiakkan dalam medium LB cair pH 9 dalam erlenmeyer 250 mL, volume kerja 50 mL untuk membuat *seed culture*. *Seed culture* diberi agitasi 200 rpm, suhu 50 °C dan diinkubasi selama 18–24 jam. *Seed culture* dimasukkan sebanyak 10% (v/v) dari total medium LB *starter* pH 9 ke dalam medium *starter*. Biakan diinkubasi pada suhu 50 °C dengan agitasi 200 rpm, sampai *optical density* (OD) terukur 0,6–0,8 dalam spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm. Ketika OD biakan sudah mencapai rentang 0,6–0,8 biakan dimasukkan ke dalam masing-masing media produksi sebanyak 10% (v/v) dari total volume medium produksi.

Media produksi yang digunakan berdasarkan media Mamo *et al.* (2006) dan Bora & Bora (2012) dengan modifikasi. Sumber N (pepton) disubstitusi dengan tepung

ikan. Sumber C (minyak) yang digunakan adalah *sunflower oil* (SFO), *palm oil* (PO), dan *crude palm oil* (CPO). Media dasar Mamo, yaitu tepung ikan 0,92%, NaCl 0,20%, Na₂CO₃ 1%, MgSO₄.7H₂O 0,01%, KH₂PO₄ 0,10% dan

CaCl₂.2H₂O 0,01% pada pH 11. Media dasar Bora & Bora mengandung tepung ikan 0,92%, NaCl 0,02%, Na₂CO₃ 0,10%, MgSO₄.7H₂O 0,04%, KH₂PO₄ 0,30% pada pH 9. Media yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Media produksi lipase

No.	Media	Komposisi (%)		
		dasar	Sumber C	CaCl ₂
1	Mamo	+	-	-
2	Mamo	+	PO 0,50	-
3	Bora & Bora	+	-	-
4	Bora & Bora	+	SFO 0,50	-
5	Bora & Bora	+	CPO 0,50	-
6	Bora & Bora	+	PO 0,50	0,09
7	Bora & Bora	+	PO 0,50	0,01

Biakan kocok medium produksi diinkubasi dalam Erlenmeyer 500 mL dengan volume kerja 100 mL, agitasi 200 rpm pada suhu 50°C selama 20 jam. Media kemudian dimasukkan dalam *falcon* dan disentrifugasi 3800 rpm selama 30 menit pada suhu 4 °C. Supernatan diambil sebagai enzim kasar.

Aktivitas Lipase

Uji aktivitas lipase dilakukan berdasarkan metode titrasi (Li *et al.*, 2014) Substrat dibuat dengan komposisi minyak zaitun 25%, *poly vinyl alcohol* (PVA) 1,5%, dan air *reverse osmosis* (RO) yang dihomogenkan dengan *homogenizer*. Substrat sebanyak 5 mL diambil dan ditambahkan dengan larutan penyangga tris-HCl 0,05 M pH 8 sebanyak 4 mL, lalu ditambahkan enzim sebanyak 1 mL. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C, 150 rpm, selama 20 menit. Setelah

inkubasi, sampel ditambahkan dengan 5 mL metanol, lalu dititrasi dengan NaOH 0,05 M. Aktivitas enzim (U/mL) dihitung berdasarkan rumus berikut:

$$\text{Aktivitas enzim (U/mL)} = \frac{(\text{volume titran sample} - \text{kontrol}) \times 1000 \times M}{\text{lama inkubasi}}$$

Optimasi Komposisi Media

Optimasi komposisi media produksi dirancang dengan menggunakan program Design Expert v.7.1.5. Plackett-Burman digunakan sebagai *screening factor* dengan delapan variabel yang merupakan komposisi dan kondisi media terpilih, yaitu konsentrasi PO, tepung ikan, NaCl, Na₂CO₃, MgSO₄, KH₂PO₄, CaCl₂, dan pH. Tiap variabel terdiri dari dua level, yaitu level bawah (-) dan level atas (+). Rancangan percobaan dapat dilihat pada Tabel 2. dan Tabel 3.

Tabel 2. Variabel bebas dan rentang level

No.	Variabel	Level	
		(-)	(+)
1	PO	0,30	1,00
2	Tepung ikan	0,70	1,40
3	NaCl	0,01	0,05
4	Na ₂ CO ₃	0,08	0,12
5	MgSO ₄	0,02	0,06
6	KH ₂ PO ₄	0,20	0,50
7	CaCl ₂	0,07	0,14
8	pH	9	10

Tabel 3. Rancangan percobaan Plackett-Burman

Run	Faktor 1 A:PO %	Faktor 2 B:T.ikan %	Faktor 3 C:NaCl %	Faktor 4 D:Na ₂ CO ₃ %	Faktor 5 E:MgSO ₄ %	Faktor 6 F:KH ₂ PO ₄ %	Faktor 7 G:CaCl ₂ %	Faktor 8 H:pH
1	1	0,7	0,05	0,12	0,02	0,5	0,14	10
2	1	1,4	0,05	0,08	0,02	0,2	0,14	9
3	1	1,4	0,01	0,08	0,02	0,5	0,07	10
4	1	0,7	0,01	0,08	0,06	0,2	0,14	10
5	0,3	0,7	0,01	0,08	0,02	0,2	0,07	9
6	0,3	0,7	0,01	0,12	0,02	0,5	0,14	9
7	0,3	0,7	0,05	0,08	0,06	0,5	0,07	10
8	1	0,7	0,05	0,12	0,06	0,2	0,07	9
9	0,3	1,4	0,05	0,12	0,02	0,2	0,07	10
10	1	1,4	0,01	0,12	0,06	0,5	0,07	9
11	0,3	1,4	0,05	0,08	0,06	0,5	0,14	9
12	0,3	1,4	0,01	0,12	0,06	0,2	0,14	10

Produksi dilakukan pada kultur kocok dengan volume 25 mL dalam erlenmeyer 125 mL selama 18 jam untuk selanjutnya diuji aktivitas enzim. Data yang didapat selanjutnya akan dianalisis dengan program Design Expert v.7.1.5. Masing-masing data dilihat signifikansinya berdasarkan nilai F dan P pada ANOVA (Wibisana *et al.*, 2015).

Mutasi *Bacillus halodurans* CM1

Bakteri dimutasi dengan cara diradiasi gamma dan diberi N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG). Langkah mutasi dengan radiasi gamma adalah bakteri dibiakkan dengan biakan kocok pada media LB pH 9 dengan volume kerja 50 mL dalam erlenmeyer 250 mL, selama 18–24 jam pada suhu 50°C, dan agitasi 200 rpm. Suspensi bakteri sebanyak 3 mL selanjutnya diradiasi. Dosis yang digunakan untuk iradiasi, yaitu 0,1; 0,2; 0,3; dan 0,4 kGy (Iftikhar *et al.*, 2010; Shahbazi *et al.*, 2014). Uji aktivitas dilakukan terhadap bakteri yang diradiasi.

Konsentrasi NTG yang digunakan untuk mutasi bakteri, yaitu 0,05; 0,1; dan 0,15 mg/mL (Vu *et al.*, 2009). Mutasi bakteri dengan NTG terbagi menjadi beberapa tahapan, yaitu tahap pembuatan biakan bakteri, pencucian, dan inkubasi.

Satu koloni bakteri diinokulasikan ke dalam 5 mL LB pH 9, diinkubasi 18–24 jam pada suhu 50°C, agitasi 200 rpm. Biakan sebanyak masing-masing 1 mL dimasukkan ke

dalam *microtube*, disentrifugasi 10000 rpm, 10 menit, 4°C. Pelet ditambahkan dengan 1 mL larutan penyangga tris-maleat (TM), dihomogenisasi. Suspensi kemudian disentrifugasi. Tahapan pencucian tersebut diulangi sebanyak dua kali. Setelah disentrifugasi, pelet ditambahkan 1 mL larutan penyangga NTG. Suspensi dihomogenisasi, kemudian diinkubasi selama 1 jam. Suspensi disentrifugasi lalu masuk ke tahap pencucian kembali. LB sebanyak 1 mL ditambahkan pada pelet, dihomogenisasi, lalu diuji aktivitasnya.

Konsentrasi NTG yang telah didapat kemudian digunakan untuk mutasi bakteri, dengan variasi waktu inkubasi. Waktu inkubasi yang digunakan, yaitu 1, 2, dan 3 jam. Metode yang digunakan sama dengan mutasi variasi konsentrasi.

Pemekatan Enzim

Pemekatan enzim dilakukan dengan metode *stirred-cell ultrafiltration* (UF), presipitasi ammonium sulfat (AS), dan *polyethylene glycol* (PEG). Enzim kasar dipekatkan bertingkat dengan UF-AS dan UF-PEG. Sampel hasil pemekatan dilihat aktivitasnya.

Enzim kasar sebanyak 200 mL dimasukkan ke dalam tangki. Perangkat UF dengan membran filter berukuran 30 kDa diletakkan dalam wadah berisi air es, sebelum gas dengan tekanan 30 psi dialirkan. Enzim dalam tangki diberi putaran 100 rpm. Sampling

dilakukan pada enzim kasar sebelum proses UF dan pada pemekatan 10x. Sampel dianalisis untuk mengetahui aktivitas enzim.

Enzim hasil pemekatan dengan UF dipekatkan kembali dengan AS. AS ditambahkan secara perlahan dengan fraksinasi bertingkat 20–80% ke dalam 10 mL enzim yang disiapkan dalam gelas beker pada wadah berisi air es sambil diputar di atas *magnetic stirrer*. Enzim diinkubasi selama 1 jam lalu disentrifugasi dalam falcon dengan kecepatan 3800 rpm selama 30 menit. Endapan yang didapat ditambahkan dengan 5 mL larutan penyangga tris-HCl 0,05 M pH 7. Supernatan hasil sentrifugasi dihitung volumenya untuk digunakan untuk fraksi selanjutnya (Borkar *et al.*, 2009).

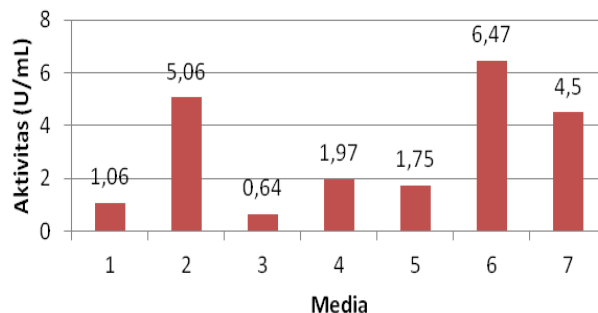
Selain dilakukan presipitasi AS, enzim hasil pemekatan dengan UF juga dipekatkan

kembali dengan PEG. Membran selofan terlebih dahulu disiapkan, kemudian sampel enzim 10 mL dimasukkan ke dalamnya. Membran sampel diletakkan dalam wadah berisi PEG, kemudian ditaburi kembali dengan PEG sampai seluruh membran tertutupi dan diletakkan dalam kulkas. Enzim dipekatkan dengan faktor pemekatan 2x, selanjutnya diuji aktivitas.

HASIL

Media Produksi

Produksi enzim dari *B. halodurans* CM1 dilakukan pada tujuh media yang berbeda. Media 6 (Bora & Bora dengan PO 0,50 % dan CaCl_2 0,09%) menghasilkan aktivitas lipase tertinggi, yaitu 6,47 U/mL. Grafik aktivitas lipase dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Aktivitas lipase tertinggi dari tiap media

Tabel 4. Kadar protein bahan dengan metode Lowry

Sampel	Kadar protein (mg/mL)
Yeast extract	10,32
Pepton	11,18
Tepung ikan	12,18

Kadar protein bahan diujikan saat pra penelitian. Tepung ikan sebagai pengganti pepton menghasilkan kadar protein yang tinggi dibandingkan bahan lainnya. Kadar protein tepung ikan sebesar 12,18 mg/mL.

Rancangan Plackett-Burman

Respon dari rancangan Plackett-Burman berupa aktivitas enzim. Run 5 memberikan hasil tertinggi dengan kadar PO 0,30%, tepung ikan 0,70%, NaCl 0,01%, Na_2CO_3 0,06%, MgSO_4 0,02%, KH_2PO_4 0,20%, CaCl_2 0,07%, dan pH 9 (Tabel 5). Data dari rancangan Plackett-Burman selanjutnya dianalisis dengan ANOVA pada Design Expert. ANOVA dari

rancangan Plackett-Burman menunjukkan model bernilai F 0,93 yang berarti bahwa model tidak signifikan terhadap *noise* (kesalahan). Nilai p (prob > F) juga menunjukkan bahwa model tidak signifikan.

Mutasi Bakteri

Hasil uji aktivitas berdasarkan Tabel 6. menunjukkan bahwa dosis 0,4 kGy menghasilkan aktivitas enzim yang paling tinggi dibandingkan dosis lain, sebesar 3,44 U/mL. Konsentrasi NTG 0,1 mg/mL (Tabel 7) dengan masa inkubasi 3 jam (Tabel 8) menghasilkan aktivitas lipase tertinggi, yaitu sebesar 5,13 U/mL.

Tabel 5. Rancangan Plackett-Burman

Run	PO (%)	T.ikan (%)	NaCl (%)	Na ₂ CO ₃ (%)	MgSO ₄ (%)	KH ₂ PO ₄ (%)	CaCl ₂ (%)	pH	Aktivitas (U/mL)
1	1	0,7	0,05	0,12	0,02	0,5	0,14	10	1,63
2	1	1,4	0,05	0,06	0,02	0,2	0,14	9	1,28
3	1	1,4	0,01	0,06	0,02	0,5	0,07	10	1,25
4	1	0,7	0,01	0,06	0,06	0,2	0,14	10	1,66
5	0,3	0,7	0,01	0,06	0,02	0,2	0,07	9	1,84
6	0,3	0,7	0,01	0,12	0,02	0,5	0,14	9	1,41
7	0,3	0,7	0,05	0,06	0,06	0,5	0,07	10	1,03
8	1	0,7	0,05	0,12	0,06	0,2	0,07	9	0,75
9	0,3	1,4	0,05	0,12	0,02	0,2	0,07	10	1,44
10	1	1,4	0,01	0,12	0,06	0,5	0,07	9	1,13
11	0,3	1,4	0,05	0,06	0,06	0,5	0,14	9	1,16
12	0,3	1,4	0,01	0,12	0,06	0,2	0,14	10	1,41

Tabel 6. Aktivitas lipase berdasarkan hasil radiasi gamma

Dosis	Aktivitas (U/mL)
0,10	3,31
0,20	3,38
0,30	3,22
0,40	3,44

Tabel 7. Aktivitas lipase berdasarkan hasil variasi konsentrasi NTG

Konsentrasi (mg/mL)	Aktivitas (U/mL)
0,05	3,44
0,10	3,56
0,15	3,63

Tabel 8. Aktivitas lipase berdasarkan hasil variasi lama inkubasi

Jam	Aktivitas (U/mL)
1	4,75
2	4,72
3	5,13

Tabel 9. Aktivitas enzim hasil pemekatan

Sampel	Aktivitas (U/mL)	Aktivitas Spesifik (U/mg)	Kenaikan Aktivitas (%)
Enzim Kasar	2,38	9,50	
UF	2,63	8,31	10,53
UF-AS	2,81	12,96	18,44
UF-PEG	2,81	9,50	18,44

Pemekatan Enzim

Aktivitas enzim mengalami peningkatan setelah dipekatkan dengan UF, yaitu dari 2,38 U/mL menjadi 2,63 U/mL. Enzim hasil UF

mengalami peningkatan aktivitas ketika dipekatkan kembali dengan ammonium sulfat, yaitu menjadi 2,81 U/mL. Hasil yang sama didapat dari pemekatan enzim hasil UF yang

dipekatkan kembali dengan PEG. Aktivitas enzim setelah dilakukan pemekatan dengan UF meningkat 10,53%. Aktivitas lipase meningkat sebesar 18,44% pada hasil pemekatan, baik UF-AS maupun UF-PEG (Tabel 9).

PEMBAHASAN

Media Produksi

Aktivitas enzim tertinggi dihasilkan pada media 6 (Bora & Bora, 2012) dengan PO 0,5% dan CaCl_2 0,09% (Gambar 1). PO berfungsi sebagai sumber karbon sekaligus substrat, sedangkan tepung ikan berfungsi sebagai sumber nitrogen. Kebutuhan energi untuk pertumbuhan mikroba dapat dipenuhi oleh adanya sumber karbon, selain dapat digunakan sebagai substrat untuk produksi enzim. Sumber nitrogen berfungsi sebagai penyedia protein dan asam amino untuk menunjang pertumbuhan bakteri dan produksi enzim (Chauhan & Garlapati, 2013).

PO memberi efek pada aktivitas lipase lebih tinggi dibandingkan dengan SFO dan CPO. Hal ini sedikit berbeda jika dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan oleh Bora & Bora (2012) menggunakan *Bacillus* sp. terhadap beberapa sumber karbon untuk produksi lipase selama 70 jam menunjukkan SFO menghasilkan aktivitas yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan PO. SFO menghasilkan aktivitas sekitar 17 U/mL, sedangkan PO sekitar 5 U/mL.

Pepton diketahui sebagai sumber nitrogen terbaik untuk produksi lipase (Kanwar *et al.*, 2002; Thomas *et al.*, 2003; Gulati *et al.*, 2005). Tepung ikan digunakan sebagai pengganti pepton karena kadar protein tepung ikan sebesar 12,18 mg/mL, sedangkan kadar protein pepton 11,18 mg/mL (Tabel 4).

Rancangan Plackett-Burman

Hasil analisis yang tidak signifikan kemungkinan disebabkan oleh data yang tidak mendukung hipotesis. Data yang tidak mendukung mungkin disebabkan oleh penentuan rentang level pada tiap variabel kurang lebar karena menurut Demain dan Davies (1999) rentang level pada Plackett-Burman harus lebar dan mengandung respon optimal. Penelitian ini mendapatkan hasil analisis yang berbeda dengan penelitian lain yang dilakukan oleh Wibisana *et al.* (2015) dengan hasil ANOVA yang signifikan pada

empat dari tujuh variabel yang dianalisis. Abdel-Fattah *et al.* (2002) menggunakan lima belas variabel faktor dalam rancangan Plackett-Burman untuk produksi lipase dari *Bacillus* sp.

Mutasi Bakteri

Berdasarkan Tabel 7, konsentrasi NTG 0,15 mg/mL merupakan konsentrasi yang memberikan hasil aktivitas terbaik. Namun untuk optimasi mutasi selanjutnya, konsentrasi NTG yang digunakan adalah 0,1 mg/mL. Konsentrasi tersebut digunakan berdasarkan literatur Vu *et al.* (2011) yang menyatakan bahwa konsentrasi NTG yang dipakai adalah 0,1 mg/mL. Jika dibandingkan aktivitas pada konsentrasi NTG 0,1 dan 0,15 mg/mL tidak jauh berbeda, hanya terpaut 0,07.

Konsentrasi NTG 0,1 digunakan untuk optimasi waktu inkubasi yang digunakan selama mutasi. Tabel 7. menunjukkan bahwa aktivitas lipase terbaik pada waktu inkubasi 3 jam. Waktu inkubasi yang lebih lama, yaitu 3 jam memungkinkan terjadinya mutasi lebih besar (Andreoni *et al.*, 1995). Jika dibandingkan aktivitas lipase hasil mutasi dengan iradiasi gamma dan mutasi dengan NTG, maka terlihat bahwa mutasi dengan NTG lebih baik dalam meningkatkan aktivitas lipase.

Pemekatan Enzim

Pemekatan enzim kasar dengan UF menggunakan membran milipore berpori 30 kDa dengan diameter 76 mm. Kondisi tersebut mengindikasikan bahwa enzim lipase yang dipekatkan dengan UF berukuran >30 kDa. Lipase yang dihasilkan oleh bakteri dari genus *Bacillus* memiliki berat molekul berkisar dari 19–40 kDa (Sangeetha *et al.*, 2010; Shah & Bhatt, 2012; Rabbani *et al.*, 2015). Enzim kasar dengan aktivitas sebesar 2,38 U/mL dipekatkan 10x, sehingga aktivitasnya menjadi 2,63 U/mL. Enzim hasil pemekatan dengan UF selanjutnya dipekatkan kembali dengan AS dan PEG.

Penambahan konsentrasi garam pada metode AS meningkatkan kelarutan protein sejalan dengan meningkatnya konsentrasi garam (*salting in*). Ammonium sulfat yang ditambahkan secara terus-menerus akan menyebabkan kelarutan protein menurun (*salting out*) yang berarti protein hampir sepenuhnya terendapkan (Wingfield, 2001).

Enzim lipase dipekatkan dengan AS sampai fraksi 20%. Hasil fraksi 20% dilarutkan dalam larutan penyangga tris-HCl 0,05 M pH 7, kemudian didialisis. Aktivitas enzim lipase meningkat dari 2,63 U/mL menjadi 2,81 U/mL. Adanya peningkatan aktivitas enzim tersebut, sesuai dengan penelitian yang dilakukan Nurhasanah & Herasasi (2008) yang menyatakan pemekatan dengan ammonium sulfat mampu meningkatkan aktivitas enzim lipase.

Enzim hasil pemekatan dengan UF juga dipekatkan dengan PEG. Membran dialisis yang digunakan mempunyai ukuran pori 12 kDa, sedangkan PEG berukuran 20 kDa. PEG akan menyebabkan molekul pada enzim yang berukuran lebih kecil dari 12 kDa akan tertarik keluar membran, sedangkan PEG tidak dapat masuk ke dalam membran karena ukurannya lebih besar dari 20 kDa. Aktivitas enzim lipase hasil PEG sebesar 2,81 U/mL. Hasil pemekatan lipase dapat dilihat pada Tabel 9.

KESIMPULAN

Aktivitas lipase tertinggi *B. halodurans* dihasilkan pada media Bora & Bora yang mengandung 0,5% PO dan 0,09% CaCl₂. Mutasi dengan NTG 0,1 mg/mL inkubasi 3 jam meningkatkan aktivitas lipase paling tinggi dibandingkan dengan sinar gamma. Pemekatan enzim dengan metode UF-AS dan UF-PEG mampu meningkatkan aktivitas enzim dengan nilai sama, sebesar 18,44%.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kepada staf Biokatalis, LAPTIAB, BPPT, Serpong dan pihak-pihak yang telah membantu selama proses penelitian.

REFERENSI

- Abdel-Fattah, Y. R., Soliman, N. A., Gaballa, A. A., Sabry, S. A., & El-Diwanly, A. I. (2002). Lipase production from a novel thermophilic *Bacillus* sp.: application of Plackett-Burman design for evaluating culture conditions affecting enzyme formation. *Acta Microbiologica Polonica*, 51(4), 353-366.
- Anbu, P., Gopinath, S. C. B., Cihan, A. C., & Chaulagain, B. P. (2013). Microbial enzymes and their applications in industries and medicine. *BioMed Research International*, 2013, 1-2.
- Andreoni, V., Bernasconi, S., & Bestetti, G. (1995). Biotransformation of ferulic acid and related compound by mutant strains of *Pseudomonas fluorescens*. *Applied Microbial Biotechnology*, 42, 830-835.
- Bora, L. & Bora, M. (2012). Optimization of extracellular thermophilic highly alkaline lipase from thermophilic *Bacillus* sp. isolated from Hot Spring Arunachal Pradesh, India. *Brazilian Journal of Microbiology*, 30-42.
- Borkar, P. S., Bodade, R. G., Rao, S. R., & Khobragde, C. N. (2009). Purification and characterization of extracellular lipase from a new strain-*Pseudomonas aeruginosa* SRT 9. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40, 358-366.
- Chauhan, M., & Garlapati, V. K. (2013). Production and characterization of a halo-, solvent-, thermo-tolerant alkaline lipase by *Staphylococcus arlettae* JPBW-1, isolated from rock salt mine. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 171, 1429-1443.
- Damaso, M. C. T., Passianoto, M. A., de Freitas, S. C., Freire, D. M. G., Lago, R. C. A., & Couri, S. (2008). Utilization of agroindustrial residues for lipase production by solid-state fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, 676-681.
- Devi, A. S., Devi, K. C., & Rajendiran, R. (2012). Optimization of lipase production using *Bacillus subtilis* by response surface methodology. *International Journal of Biological, Veterinary, Agricultural and Food Engineering*, 6(9), 164-169.
- Gulati, R., Isar, J., Kumar, V., Prasad, A. K., Parmar, V. S., & Saxena, R. K. (2005). Production of novel alkaline lipase from *Fusarium globosum* using neem oil and its applications. *Pure and Applied Chemistry*, 77, 251-262.
- Iftikhar, T., Niaz, M., Hussain, Y., Abbas, S. Q., Ashraf, I., & Zia, M. A. (2010). Improvement of selected strains through gamma irradiation for enhanced lipolytic potential. *Pakistan Journal of Botany*, 42(4), 2257-2267.

- Kanwar, L., Gogoi, B. K., & Goswami, P. (2002). Production of *Pseudomonas* lipase in n-Alkane substrate and its isolation using ammonium sulphate precipitation technique. *Bioresouce Technology*, 84, 207-211.
- Li Xiao-Lu, Zhang Wen-Hui, Wang Ying-Dong, Dai Yu-Jie, Zhang Hui-Tu, Wang Yue, Wang Hai-Kuan, & Lu Fu-Ping. (2014). A high-detergent-performance, cold-adapted lipase from *Pseudomonas stutzeri* PS59 suitable for detergent formulation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 102, 16-24.
- Liu Xiangyang, Ren Biao, Gao Hong, Liu Mei, Dai Huanqin, Song Fuhang, Yu Zhenyan, Wang Shujin, Hu Jiangchun, Kokare, C. R., & Zhang Lixin. (2012). Optimization for the production of surfactin with a new synergistic antifungal activity. *Plos One*, 7(5), 1-9
- Mala, J. G. S. & Takeuchi, S. (2008). Understanding structural feature of mikrobial lipases-An Overview. *Analytical Chemistry Insights*, 3, 9-19.
- Mamo, G., Rajni, H. K., & Mattiason, B. (2006). A thermostable alkaline active endo- β 1-4 xylanase from *Bacillus halodurans* S7: purification and characterization. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(7), 1492-1498.
- Nurhasanah & Herasari, D. (2008). Pemurnian enzim lipase dari bakteri lokal dan aplikasinya dalam reaksi esterifikasi (Prosiding). Seminar Nasional Sains dan Teknologi-II, 17-18 November. Universitas Lampung, Bandar Lampung.
- Rabbani, M., Shafiee, F., Shayegh, Z., Sadeghi, H. M. M., Shariat, Z. S., Etemadifar, Z., & Moazen, F. (2015). Isolation and characterization of a new thermoalkalophilic lipase from soil bacteria. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 14(3), 901-906.
- Sangeetha, R., Geetha, A., & Arulpandi, I. (2010). Concomitant production of protease and lipase by *Bacillus licheniformis* VSG1: production, purification and characterization. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41, 179-185.
- Shah, K. R. & Bhatt, S. A. (2012). Purification and characterization of lipase from *Bacillus subtilis* Pa2. *Journal of Biochemical and Technology*, 3(3), 292-295.
- Shahbazi, S., Ispareh, K., Karimi, M., Askari, H., & Ebrahimi, M. A. (2014). Gamma and UV radiation induced mutagenesis in *Trichoderma reesei* to enhance cellulases anzyme activity. *International Journal of Farming and Allied Science*, 3(5), 543-554.
- Sharma, R., Chisti, Y., & Banerjee, U. C. (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, 19, 627-662.
- Sharma, V. & Singh, P. K. (2012). Strain improvement of *Bacillus coagulans* and *Geobacillus stearothermophilus* for enhanced thermostable cellulase production and the effect of different metal ions on cellulase activity. *International Journal of Engineering Science and Technology*, 4(11), 4704-4709.
- Tambunan, U. S. F., Randy, A., & Parikesit, A. A. (2014). Design of *Candida antartica* lipase B thermostability improvement by introducing extra disulfide bond into the enzyme. *OnLine Journal of Biological Sciences*, 14 (2), 108-118.
- Thomas, A., Manoj, M. K., Valsa, A., Mohan, S., & Manjula, R. (2003). Optimization of growth condition for the production of extra cellular lipase by *Bacillus mycoides*. *Indian Journal of Microbiology*, 43, 67-69.
- Ulfah, M., Helianti, I., Wahyuntari, B., & Nurhayati, N. (2011). Characterization of new thermoalkalophilic xylanase-producing bacterial strain isolated from Cimanggu Hots Spring, West Java, Indonesia. *Microbiology Indonesia*, 5(3), 139-143.
- Vu, V. H., Pham, T. A., & Kim, K. (2009). Fungal strain improvement for cellulase production using repeated and sequential mutagenesis. *Mycobiology*, 37(4), 267-271.

- Vu, V. H., Pham, T. A., & Kim, K. (2011). Improvement of fungal cellulase production by mutation and optimization of solid state fermentation. *Mycobiology*, 39(1), 20-25.
- Wibisana, A., Sumaryono, W., Sudiro, T. M., & Sudarmono, P. P. (2015). Optimization of surfactin production by *Bacillus amyloliquefaciens* MD4-12 using response surface methodology. *Microbiology Indonesia*, 9(3), 120-128.
- Wingfield, P. T. (2001). Protein precipitation using ammonium sulphate. *Current Protocols in Protein Science*, 84, A.3F 1-9.
- Xu, H., Jia, S., & Liu, J. (2011). Development of mutant strain of *Bacillus subtilis* showing enhanced production of acetoin. *African Journal of Biotechnology*, 10(5), 779-788.